

# 核桃仁提取物对 AD 模型大鼠海马和皮质区 ChAT、AChE 活性的影响

周丽莎, 朱书秀, 张雯娟, 王海胜

(江汉大学 医学院, 湖北 武汉 430056)

**摘要:**目的: 观察核桃仁提取物对阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)模型大鼠中枢胆碱能系统活性的影响, 进而探讨核桃仁提取物对 AD 的防治作用。方法: 采用双侧 Meynert 核立体定向注射微量  $A\beta_{1-40}$  制造 AD 大鼠模型, 分别使用核桃仁的 3 种提取物灌胃干预后, 检测大鼠海马与皮质区胆碱乙酰转移酶(ChAT)、乙酰胆碱酯酶(AChE)活性。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠海马和皮质区 ChAT 活性和 AChE 活性降低, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。经核桃仁提取物灌胃干预后的各组大鼠海马和皮质区 ChAT 活性和 AChE 活性均增强, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。核桃仁 3 种提取物的干预组间比较, 核桃仁水提取物干预组、核桃仁丙酮提取物干预组皮质区 ChAT 活性和 AChE 活性分别较核桃仁乙醇提取物干预组强, 差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论: 核桃仁提取物可明显提高大鼠海马和皮质区胆碱能系统活性, 从而发挥防治阿尔兹海默病的作用, 以核桃仁水提取物和核桃仁丙酮提取物疗效为佳。

**关键词:** 核桃仁提取物; 阿尔兹海默病; 乙酰胆碱酯酶; 胆碱乙酰转移酶

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-0143(2011)02-0070-03

阿尔兹海默病(AD)是一种发生于老年和老年前期、以进行性认知功能障碍和行为损害为特征的中枢神经系统退行性疾病。有关其发病确切机理现有多种假说, 其中影响较广的胆碱能学说逐渐被学术界普遍接受<sup>[1]</sup>。胆碱乙酰转移酶(ChAT)和乙酰胆碱酯酶(AChE)分别为乙酰胆碱(Ach)的合成酶和分解酶, 常被用来评价胆碱能神经系统活性<sup>[2-3]</sup>。本实验采用核桃仁提取物对 AD 大鼠进行治疗, 观察其对大鼠胆碱能神经系统活性的影响, 为有效防治 AD 提供可靠实验资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验药物

核桃仁水提取物溶液、核桃仁乙醇提取物溶液、核桃仁丙酮提取物溶液。取核桃仁 *Semen Juglandis*, 经鉴定为正品, 晒干, 粉碎, 加水浸泡 24 h, 分别使用水、乙醇和丙酮提取至核桃仁生药质量浓度为 1 g/mL。

### 1.2 实验动物

40 只 3 月龄雄性健康 SD 大鼠(华中科技大学同济医学院实验动物中心提供), 体重 200 ~ 250 g。实验前于本校动物实验中心饲养 1 周, 室温适宜, 环境安静。

### 1.3 试剂及仪器

$A\beta_{1-40}$  淀粉蛋白(使用前孵化), 青霉素溶液, 10% 的水合氯醛溶液, 乙酰胆碱酯酶试剂盒, 胆碱乙酰转移酶试剂盒及考马斯亮蓝测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20091016); 台式牙钻机(成都康发医疗器械有限公司), 江湾 II 型脑立体定位仪(上海江湾医疗器械厂), 5  $\mu$ L 微量注射器(上海医用仪器厂), 岛津 UV-265 型紫外可见光比色计, LG-3A 型高速冷冻离心机(北京医用离心机厂)。

### 1.4 方法

1.4.1 动物分组 经 Y 型水迷宫初筛得健康大鼠 36 只, 并将其随机分为 6 组, 正常组、假手术组、模型组、核桃仁水提取物干预组(后简称

收稿日期: 2011-03-17

基金项目: 武汉市科技攻关项目(200851799524-09)

作者简介: 周丽莎(1958—), 女, 湖北武汉人, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 主要从事针灸对神经免疫调节机制的研究。

“水提干预组”)、核桃仁乙醇提取物预干预组(后简称“乙醇干预组”)、核桃仁丙酮提取物预干预组(后简称“丙酮干预组”),每组6只。水提干预组、乙醇干预组和丙酮干预组各予以相应的核桃仁提取药物(0.4 g/100 g)灌胃干预,正常组、假手术组和模型组不做任何处理,常规饲养。

1.4.2 制造AD模型<sup>[4]</sup> 各组大鼠使用10%水合氯醛380 mg/kg腹腔注射麻醉,固定于脑立体定位仪。脑立体定位仪固定平颅头位切开皮肤及皮下组织。参照《大鼠脑立体定位图谱》<sup>[5]</sup>,前囟后1.4 mm,旁开3.0 mm,自脑表面进针7.0 mm分别至双侧Meynert基底核,用微量注射器将聚集状态的 $A\beta_{1-40}$ 各1  $\mu$ L(5  $\mu$ g)在2 min内缓慢注入,留针10 min,以使 $A\beta_{1-40}$ 充分浸润局部组织,注射完毕后将微量注射器在7 min内缓慢抽出。假手术组注射等量的生理盐水。所有操作均在无菌条件下进行,术后每只大鼠腹腔注射青霉素1万U,缝合切口,常规饲养。

造模完成后第31天,对大鼠再次进行Y字型水迷宫筛选,凡15次测试中正确次数较造模前下降1/3者为造模成功<sup>[6]</sup>。

1.4.3 观察指标及检测方法 取各组大鼠新鲜海马和皮质,称重后加9倍生理盐水,制备10%匀浆,经离心后,取上清液按照乙酰胆碱酯酶试剂盒说明书、考马斯亮蓝测定试剂盒说明书和胆碱乙酰转移酶试剂盒说明书分别检测各组大鼠海马和皮质脑组织中ChAT活性和AChE活性。

1.4.4 统计方法 数据采用SPSS13.0统计软件进行处理分析。结果以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,分别进行单因素方差分析比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠海马及皮质ChAT活性的比较

结果见表1。从表1可以看出,海马区ChAT活性比较中,正常组与假手术组比较,ChAT活性差异无统计学意义( $P > 0.05$ );模型组分别与正常组和假手术组比较,ChAT活性明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );水提干预组、乙醇干预组和丙酮干预组分别与模型组比较,ChAT活性明显增强( $P < 0.01$ );水提干预组、乙醇干预组和丙酮干预组组间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

皮质区ChAT活性比较中,正常组与假手术组比较,ChAT活性差异无统计学意义( $P >$

0.05);模型组分别与正常组和假手术组比较,ChAT活性明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );水提干预组、乙醇干预组和丙酮干预组分别与模型组比较,ChAT活性明显增强( $P < 0.01$ );水提干预组与丙酮干预组组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );水提干预组与丙酮干预组分别与乙醇干预组比较,ChAT活性较强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表1 各组大鼠海马及皮质ChAT活性的比较

( $\bar{x} \pm s, n = 36$ )

| 组别    | n | 海马 ChAT 活性/<br>(IU·g <sup>-1</sup> ) | 皮质 ChAT 活性/<br>(IU·g <sup>-1</sup> ) |
|-------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 正常组   | 6 | 98.433 $\pm$ 1.044                   | 97.615 $\pm$ 1.407                   |
| 假手术组  | 6 | 94.578 $\pm$ 2.556                   | 95.450 $\pm$ 2.142                   |
| 模型组   | 6 | 42.177 $\pm$ 1.665 <sup>ab</sup>     | 41.447 $\pm$ 2.890 <sup>ab</sup>     |
| 水提干预组 | 6 | 74.388 $\pm$ 2.097 <sup>ac</sup>     | 74.170 $\pm$ 1.723 <sup>acd</sup>    |
| 乙醇干预组 | 6 | 70.530 $\pm$ 2.275 <sup>ac</sup>     | 70.167 $\pm$ 0.635 <sup>ac</sup>     |
| 丙酮干预组 | 6 | 74.170 $\pm$ 1.090 <sup>ac</sup>     | 73.296 $\pm$ 1.423 <sup>acd</sup>    |

注:与正常组比较,a: $P < 0.01$ ;与假手术组比较,b: $P < 0.01$ ;与模型组比较,c: $P < 0.01$ ;与乙醇干预组比较,d: $P < 0.01$ 。

### 2.2 各组大鼠海马及皮质AChE活性的比较

结果见表2。从表2可以看出:海马区AChE活性比较中,正常组与假手术组比较,AChE活性差异无统计学意义( $P > 0.05$ );模型组分别与正常组和假手术组比较,AChE活性明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );水提干预组、乙醇干预组和丙酮干预组分别与模型组比较,AChE活性明显增强( $P < 0.01$ );水提干预组与丙酮干预组组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ );水提干预组与丙酮干预组分别与乙醇干预组比较,AChE活性较强,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

表2 各组大鼠海马及皮质AChE活性的比较

( $\bar{x} \pm s, n = 36$ )

| 组别    | n | 海马 AChE 活性/<br>(U·mg <sup>-1</sup> ) | 皮质 AChE 活性/<br>(U·mg <sup>-1</sup> ) |
|-------|---|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 正常组   | 6 | 0.387 $\pm$ 0.047                    | 0.419 $\pm$ 0.026                    |
| 假手术组  | 6 | 0.305 $\pm$ 0.055                    | 0.378 $\pm$ 0.044                    |
| 模型组   | 6 | 0.158 $\pm$ 0.036 <sup>ab</sup>      | 0.196 $\pm$ 0.060 <sup>ab</sup>      |
| 水提干预组 | 6 | 0.360 $\pm$ 0.060 <sup>acd</sup>     | 0.426 $\pm$ 0.121 <sup>ac</sup>      |
| 乙醇干预组 | 6 | 0.261 $\pm$ 0.042 <sup>ac</sup>      | 0.338 $\pm$ 0.061 <sup>ac</sup>      |
| 丙酮干预组 | 6 | 0.370 $\pm$ 0.045 <sup>acd</sup>     | 0.435 $\pm$ 0.046 <sup>ac</sup>      |

注:与正常组比较,a: $P < 0.01$ ;与假手术组比较,b: $P < 0.05$ ;与模型组比较,c: $P < 0.05$ ;与乙醇干预组比较,d: $P < 0.01$ 。

皮质区AChE活性比较中,正常组与假手术组

比较, AchE 活性差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 模型组分别与正常组和假手术组比较, AchE 活性明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 水提干预组、乙醇干预组和丙酮干预组分别与模型组比较, AchE 活性明显增强 ( $P < 0.01$ ); 水提干预组、乙醇干预组和丙酮干预组组间比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ).

### 3 讨论

《本草纲目》中记载核桃仁有“补气养血, 润燥化痰, 益命门”的功效, 被认为是补益气血、健脑益智、抗衰老的佳品. 有大量相关实验报道称核桃仁具有清除自由基、抗氧化、抗衰老、补肾壮阳的作用<sup>[7-8]</sup>, 但是尚无其对中枢胆碱能系统活性方面的相关研究, 据此, 本实验就此开展核桃仁的3种提取物对AD大鼠中枢胆碱能系统活性方面影响的实验研究, 从而寻找其防治AD的价值. AD是发病率较高的中枢神经系统退变性疾病, 约占老年期痴呆的50%, 临床表现为学习记忆障碍、失用、失认等. 其发病机理众说纷纭, 现以胆碱能学说逐渐被学术界普遍接受. 临床上AD患者Meynert基底核中海马和皮质区ChAT活性和AchE活性明显低于正常人<sup>[1]</sup>, ChAT是Ach的合成酶, AchE是Ach的分解酶, 二者相辅相成共同维持脑内Ach含量的动态平衡, 故防治AD可以考虑从ChAT活性和AchE活性方面进行研究.

本研究以双侧Meynert核立体定向注射微量 $A\beta_{1-40}$ 制造AD大鼠动物模型, 探讨核桃仁提取物对大鼠胆碱能系统的影响及其防治阿尔兹海默病的作用. ChAT活性和AchE活性有随年龄增加而衰减的趋势, 成为AD发病的重要因素. 本实验发现, 3个干预组海马和皮质区ChAT活性和AchE活性均较模型组增强, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ). 说明核桃仁提取物能提高大鼠胆碱能系统

的活性而发挥防治AD的作用. 在3个干预组ChAT活性和AchE活性的比较过程中, 发现乙醇干预组皮质ChAT活性和海马AchE活性的提高没有水提干预组和丙酮干预组的作用明显, 且结果比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明核桃仁的水提取物和丙酮提取物对大鼠胆碱能系统活性的调节优于乙醇提取物.

综上所述, 核桃仁提取物可明显提高大鼠海马和皮质区胆碱能系统活性, 提示其可能具有防治阿尔兹海默病的作用.

### 参考文献:

- [1] Giacobini E. Cholinergic function and Alzheimer's disease[J]. Int J Geriatr Psychiatry, 2003, 18(Suppl): S1.
- [2] Nordberg A. Functional studies of cholinergic activity in normal and Alzheimer disease states by imaging technique[J]. Prog Brain Res, 2004, 145:301-309.
- [3] Lai M K, Tsang S W, Garcia-Alloza M, et al. Selective effects of the APOE epsilon 4 allele on presynaptic cholinergic markers in the neocortex of Alzheimer's disease[J]. Neurobiol Dis, 2006, 22(3):555-561.
- [4] 朱书秀, 周丽莎, 孙国杰. 电针对阿尔茨海默病模型大鼠行为学及海马区IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2008, 31(4):55-57.
- [5] 包新民, 舒斯云. 大鼠脑立体定位图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994.
- [6] 徐淑云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991:661-662.
- [7] 陈勤, 李磊珂, 吴耀. 核桃仁的成分与药理研究进展[J]. 安徽大学学报: 自然科学版, 2005, 29(1):86-89.
- [8] 毕敏, 尹政. 核桃仁提取物抗脑衰老作用的实验研究[J]. 现代中药研究与实践, 2006, 20(3):35-37.

(责任编辑: 范建凤)